

# シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)NHL10 遺伝子の機能解析

著者	鄭 明淑
号	1
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第3号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/62499">http://hdl.handle.net/10097/62499</a>

	Zheng Ming Shu
氏 名（本 籍 地）	鄭 明 淑
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第3号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 分子生命科学専攻
論 文 題 目	シロイヌナズナ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )NHL10 遺伝子の 機能解析
博士論文審査委員	(主査) 教 授 草 野 友 延 教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 高 橋 秀 幸

## 論文内容の要旨

植物の病原菌に対する抵抗性は一般的に非常に高い特異性を示しており、またこの特異性は植物側の *R* 遺伝子産物と病原菌側の非病原性遺伝子産物間の認識に依存する。抵抗性 *R* 遺伝子を介したシグナル経路には下流に複数の鍵となる遺伝子が存在するが、シロイヌナズナの *NDR1* 遺伝子もその1つである。この遺伝子に欠損をもつ植物はカビや細菌に罹病性となる。*NDR1* 遺伝子の産物は、病原菌に対する過敏感応答時に誘導されるタバコの *HIN1* 遺伝子の産物(HIN1)と構造類似性を持っており、こうした一群の遺伝子は *NDR1/HIN1-like(NHL)* 遺伝子と呼ばれている。

シロイヌナズナには *NHL* 遺伝子が 45 個あり、分子系統解析により 4 クラスに分類された(図 1-2)。本研究ではまずシロイヌナズナの *NHL* メンバーのうち *HIN1* と相同性が最も高い 9 つの遺伝子を選び、*NDR1* 遺伝子と共に種々の条件下での発現解析を行い、このうち特徴的な発現パターンを示した *NHL10* 遺伝子の発現制御機構および機能を解析した。

第 1 章では、組織特異性の解析から *NHL10* 遺伝子は老化葉特異的に発現する遺伝子であり(図 1-4)、CMV(cucumber mosaic virus)感染による HR 時の発現解析から、*NHL10* 遺伝子は HR 特異的に発現が誘導されることが明らかになった(図 1-5)。また細胞外からスペルミン(Spm)を与えた時、*NHL10* 遺伝子の発現レベルが増加した(図 1-6)。このように *NHL10* 遺伝子の発現パターンは非常にタバコの *HIN1* と似ており、また *NHL10* のアミノ酸配列は *HIN1* と最も高い相同性を示していることからシロイヌナズナの *NHL10* 遺伝子はタバコ *HIN1* のオルソログであると考えられた。

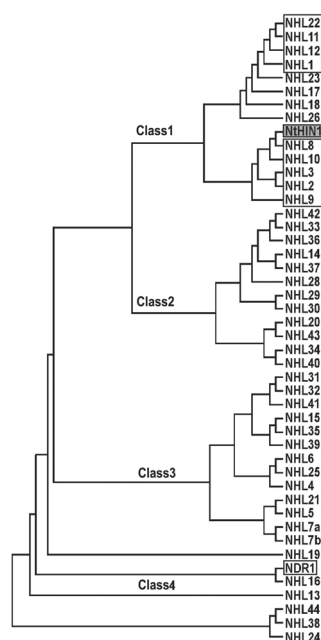


図 1-2. シロイヌナズナ *NHL* 遺伝子群の分子系統樹

データ・マイニングによりシロイヌナズナに見出した 45 種の *NHL* 遺伝子は、*NHL1* (At3g11660), *NHL2* (At3g11650), *NHL3* (At5g06320), *NHL4* (At1g54540), *NHL5* (At1g61760), *NHL6* (AtAt1g65690), *NHL7a* (At1g08140), *NHL7b* (At1g23950), *NHL8* (At1g32340), *NHL9* (At2g35460), *NHL10* (At2g35980), *NHL11* (At2g35970), *NHL12* (At2g35960), *NHL13* (At2g27080), *NHL14* (At2g27260), *NHL15* (At2g01080), *NHL16* (At3g20610), *NHL17* (At3g44220), *NHL18* (At3g52470), *NHL19* (At4g01410), *NHL20* (At4g26490), *NHL21* (At4g05220), *NHL22* (At4g09590), *NHL23* (At5g06330), *NHL24* (At5g22850), *NHL25* (MLF18.15, chromosome 5), *NHL26* (At5g53730), *NHL28* (At5g11890), *NHL29* (At1g17550), *NHL30* (At1g17620), *NHL31* (At1g64440), *NHL32* (At1g64450), *NHL33* (At1g01460), *NHL34* (At1g13050), *NHL35* (At1g70040), *NHL36* (At2g46300), *NHL37* (At3g52460), *NHL38* (At3g20590), *NHL39* (At3g54200), *NHL40* (At3g26350), *NHL41* (MOB24.18, chromosome 3), *NHL42* (At4g01110), *NHL43* (At5g56050), *NHL44* (At5g45300) 及び *NDR1* (At3g20600)である。タバコ *HIN1* (NtHIN1)は黒いボックスで示し、本研究で解析に用いた 10 種の遺伝子は四角で囲った。

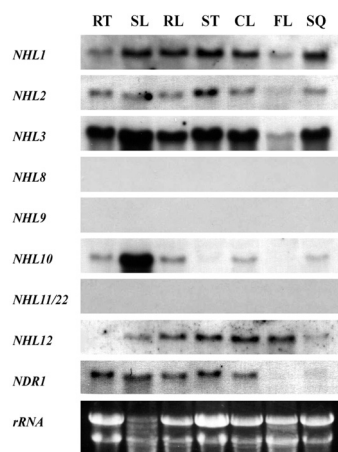


図 1-4. 10 種の *NHL* 遺伝子の組織特異性

シロイヌナズナ各組織から抽出した全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。プローブとして DIG 標識した各 cDNA の断片を使用した。EtBr で染色したゲルの状態から等量の全 RNA がロードされていることを確認した。組織の略称：RT, 根；SL, 老化葉；RL, 若い葉；ST, 茎；CL, 茎生葉；FL, 花；SQ, 莢。

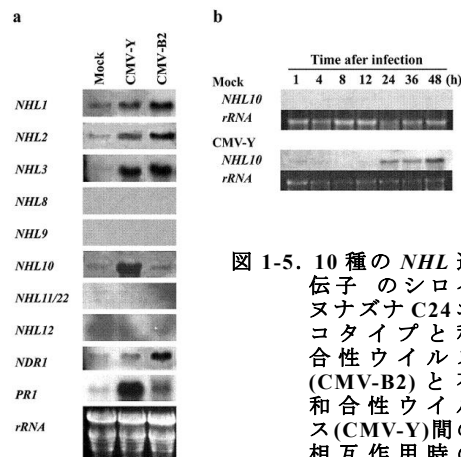


図 1-5. 10 種の *NHL* 遺伝子のシロイヌナズナ C24 エコタイプと和合性ウイルス (CMV-B2) と不和合性ウイルス (CMV-Y) 間の相互作用時の発現パターン

a. CMV-Y と CMV-B2 をそれぞれ接種してから 48 時間目のシロイヌナズナ C24 接種葉より全 RNA を抽出し、DIG 標識した cDNA 断片をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。コントロールとしてはリン酸緩衝液 (pH 7.2) を使用した。b. CMV-Y 接種葉より経時的に全 RNA を抽出し RNA ブロット解析を行った。

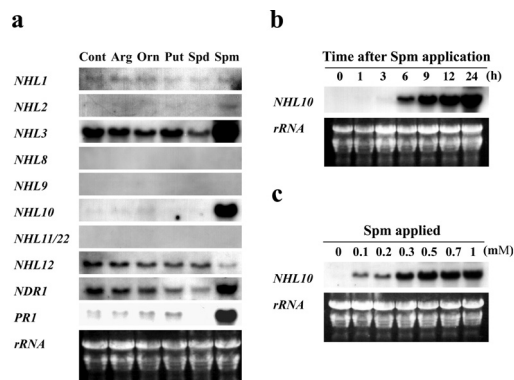


図 1-6. 10 種の *NHL* 遺伝子の発現に及ぼすポリアミン及びその生合成前駆体の影響

a. 30 日間生育したシロイヌナズナのロゼット葉の切り葉を 500 $\mu$ M のポリアミン及びポリアミン生合成前駆体であるアルギニン及びオルニチンでそれぞれ 24 時間処理し、全 RNA 抽出を行った。全 RNA (20 $\mu$ g) をノーザンブロット解析に使用した。Cont, 無処理；Arg, アルギニン；Orn, オルニチン；Put, プトレッシン；Spd, スペルミジン；Spm, スペルミン。b. *NHL10* 遺伝子のスペルミン発現後の経時的発現。スペルミンは 500 $\mu$ M で処理した。c. *NHL10* 遺伝子の発現に及ぼすスペルミン濃度の影響。異なった濃度のスペルミンで 24 時間処理した時の *NHL10* 遺伝子の発現。

SA、JA および ET シグナル欠損変異株を用いた老化、HR および Spm 処理時の *NHL10* 遺伝子の発現解析から、HR および Spm 処理時の *NHL10* 遺伝子の発現にはこれらのシグナル経路が関与しないが、老化における *NHL10* 遺伝子の発現には部分的に SA シグナル経路が関与していることを示した。

第 2 章では GFP タギング法を用いて *NHL10* や *NHL2* そして *NDR1* 遺伝子産物の細胞内局在性を検討した。*NHL2* と *NHL10* は明らかに葉緑体に局在しているのが観察された (図 2-2)。GFP 融合 *NDR1* 蛋白質はソラマメ孔辺細胞の葉緑体に GFP 蛍光が検出できたことから *NDR1* も葉緑体に局在する可能性が高いと考えられるものの、細胞の表層部分でも蛍光が見られることから細胞膜に局在することも考えられた。

第 3 章では GUS レポーター遺伝子の開始コドンの上流に長さの異なる 4 種の *NHL10* 遺伝子プロモーター領域をもつ形質転換植物を作出し、*NHL10* 遺伝子のプロモーター解析を

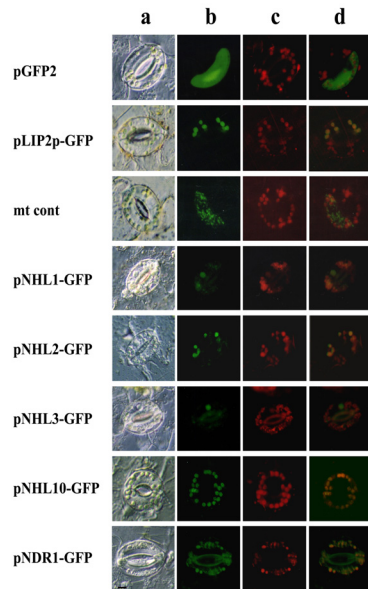


図 2-2. 5 種の NHL-GFP 融合蛋白質のソラマメ表皮細胞における細胞内局在性

基本ベクターであり GFP 由来蛍光が細胞質全体に予想される pGFP2, 葉緑体に GFP 蛍光が予想される pLIP2-GFP 及びミトコンドリアに GFP 蛍光が予想される mt-GFP をコントロールとして使用した. a. 孔辺細胞の明視野像, b. GFP 蛍光, c. 葉緑体自家蛍光, d. b と c を重ね合わせた像. 図中の棒は 5μm を示す.

行った。*NHL10* 遺伝子のプロモーター領域を-198bp まで削っても老化、HR 及び Spm 処理により GUS 活性が検出されるが、-93bp まで削ると GUS シグナルが検出されないことから、この-198bp から-93bp までの 106bpDNA 断片に老化、HR 及び Spm 処理による *NHL10* 遺伝子の発現に関与するシス配列があると考えられた。

第 4 章では *NHL10* 遺伝子の生体内の機能の解析を行った。*NHL10* 遺伝子をセンス鎖で過剰発現させた植物では明らかに CMV の増殖が遅れ、しかもその遅れは *NHL10* 遺伝子の発現に依存していることから (図 4-5)、*NHL10* 遺伝子は CMV 抵抗性に関与していることが明らかになった。*NHL10* 遺伝子を過剰発現させた植物は、通常の成長や発育及び老化過程で見かけ上、野生株と違いが見られなかった。*NHL10* 遺伝子を過剰発現させた植物は、

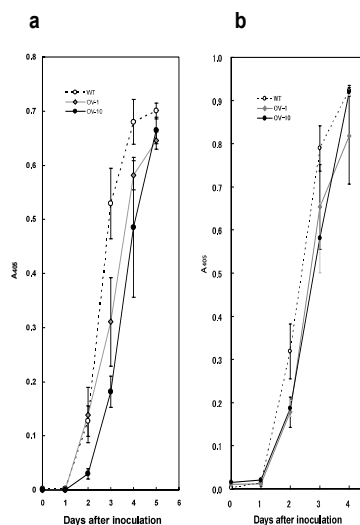


図 4-5. *NHL10* 遺伝子過剰発現植物の CMV 抵抗性の解析

14 日間育成した *NHL10* 遺伝子過剰発現植物 OV-1 と OV-10 に (a) 10ng/ml と (b) 100ng/ml の CMV-Y をそれぞれ接種し、時間経過に伴う CMV の外被蛋白質量を抗 CMV 抗体を用いて測定した. 詳細は材料と方法を参照されたい.

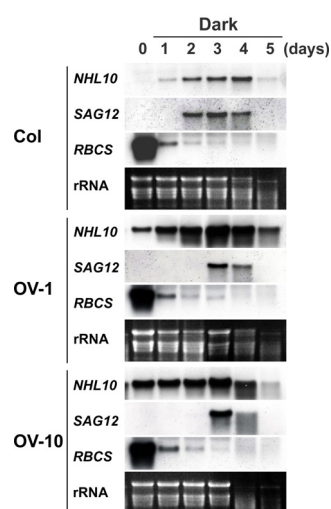


図 4-6. *NHL10* 遺伝子過剰発現植物を暗処理した際の *SAG12* と *RBCS* 遺伝子の発現の変化

30 日間育成した *NHL10* 遺伝子過剰発現植物 OV-1 と OV-10 と野生株の切り葉に暗処理を行った. 暗処理後 1 日から 5 日目まで経時的に採取した試料から全 RNA を抽出し、RNA プロット解析を行った. *NHL10* の発現レベルを確認すると同時に *SAG12* と *RBCS* をプローブに用いて RNA プロット解析を行った.

光合成に関与している *RBCS* 遺伝子の発現パターン及び老化マーカー遺伝子の発現パターンにおいても野生株に比べて変化がないことから *NHL10* 遺伝子の老化過程における役割はまだ不明である。しかし暗処理で誘導される老化でチオールプロテアーゼをコードする *SAG12* 遺伝子の発現が、野生株に比べてほぼ 1 日も遅れることを見出した (図 4-6)。この発見が、老化における *NHL10* 遺伝子の役割を明らかにするための端緒と成る事を期待したい。

以上、本論文では 10 種の *NHL* 遺伝子の発現パターンの解析から *NHL10* 遺伝子に着目し、その発現制御、プロモーター解析及び遺伝子産物の細胞内での局在部位と機能につき解析を行った。その結果、*NHL10* 遺伝子が CMV に対する抵抗性に寄与することを初めて明らかにした。また *NHL10* 遺伝子は老化誘導性 *SAG12* 遺伝子の発現を抑制する事を示し、老化過程における機能解明への途を開いた。

## 論文審査結果の要旨

鄭明淑さんは本学大学院農学研究科で修士号を取得後、生命科学研究科の後期課程に編入学してきた。本学後期課程では、下に述べる *NHL* 遺伝子の機能解明を目的とした。植物の病原菌抵抗性は植物側の *R* 遺伝子産物と病原菌側の非病原性遺伝子産物間の認識に依存する。抵抗性 *R* 遺伝子を介したシグナル経路には下流に複数の鍵となる遺伝子が存在するが、シロイヌナズナの *NDRI*(non race specific disease resistance) 遺伝子もその 1 つである。この遺伝子に欠損をもつ植物はカビや細菌に罹病性となる。*NDRI* 遺伝子の産物は、病原菌に対する過敏感応答(HR, hypersensitive response) 時に誘導されるタバコの *HINI* 遺伝子の産物(HIN1)と構造類似性を持っており、こうした一群の遺伝子は *NDRI/HINI-like(NHL)* 遺伝子と呼ばれている。鄭明淑さんはシロイヌナズナが 45 個の *NHL* 遺伝子を持つ事、そしてそれらが分子系統解析により 4 クラスに分類される事を示した。彼女は、このうちタバコ *HINI* と相同性が最も高い 9 遺伝子を選び、*NDRI* 遺伝子と共に種々の条件下での発現解析を行った。この 10 種の *NHL* 遺伝子のうち老化葉で高発現し、キュウリモザイクウイルス(CMV)に対する過敏感反応時、およびポリアミンの 1 種のスペルミンによって特徴的に発現する *NHL10* 遺伝子の発現制御、プロモーター解析及び遺伝子産物の細胞内での局在部位と機能につき解析を行い、いくつかの新たな知見を得た。特筆すべきは、*NHL10* 遺伝子が CMV に対する抵抗性に寄与することを初めて明らかにしたことである。また *NHL10* 遺伝子を過剰発現した植物を用いて、*NHL10* が老化誘導性 *SAG12* 遺伝子の発現を抑制する事を示し、老化過程における機能解明への途を開いた。

本研究の一部は *Planta* に印刷中であり、2 報目は *Plant Cell Physiol.*に受理された。学位論文の第 3 章と第 4 章はそれぞれ投稿準備中である。こうした事実は、彼女が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、鄭明淑さん 提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。